

Title	In vivo evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase (Abstract_要旨)
Author(s)	Tsuda, Masataka
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2017-05-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k20559
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	津 田 雅 貴
論文題目	<i>In vivo</i> evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase δ (複製 DNA ポリメラーゼ δ による損傷乗越え合成の <i>in vivo</i> での証拠)		
(論文内容の要旨)			
<p>DNA ポリメラーゼδ(Polδと略す)は DNA 複製の為の DNA 合成酵素であり、非常に正確に合成する（変異挿入率は 10^{-6}）。変異挿入率を低くする分子機構は、以下の 2 つである。Polδはその触媒活性中心が非常に空間的に狭く、ミスペアーした 2 つのヌクレオチド（鋳型鎖の dNMP と酵素によって取込まれる dNTP）は触媒活性中心に入りこめない。その結果、Polδは、鋳型と正確にペアーする dNTP しか DNA 合成に使えない。万が一、プライマーの 3'末端にミスペアーのヌクレオチドが追加されても、その間違っしたヌクレオチドは、Polδはその DNA 切断活性によって除去できる(校正活性)。以上の 2 つの機構を使い Polδは、複製時の変異を防止する。</p> <p>以上に説明した DNA 合成を正確に実行する 2 つの機構は、損傷乗越え DNA 合成を起こらなくする。損傷乗越え DNA 合成とは、損傷した鋳型を使える特殊な DNA 合成である。例えば、紫外線などにより損傷を受けたヌクレオチドが鋳型鎖に存在すると、Polδは損傷ヌクレオチドの対面に取込んだいかなる dNTP もミスペアーと認識し DNA 合成を停止する。万が一、Polδが損傷ヌクレオチドの対面に dNTP を取込んでも、校正活性が取込まれたヌクレオチドを除去する。Polδは、このように損傷乗越え DNA 合成を一切しないと信じられていた。そして Polδが鋳型鎖の損傷部位で DNA 複製を停止すると、損傷乗越えポリメラーゼと呼ばれる特殊なポリメラーゼが損傷部位の DNA 合成を行う。</p> <p>Polδは 4 つのサブユニット(POLD1～4)から成るホロ酵素である。POLD1 には DNA 合成活性と校正活性がある。POLD3 を遺伝子欠損させたニワトリ DT40 細胞(<i>POLD3</i>^{-/-}細胞)を解析し、POLD3 が損傷乗越え DNA 合成を促進するという結論を得た。この結論は、Polδそのものが損傷乗越え DNA 合成を行うことを示唆する。この仮説を検証する為に、<i>POLD3</i>^{-/-} <i>POLD1</i>^{exo}細胞(<i>POLD3</i>^{-/-}細胞に Polδの校正活性を不活化する点変異を挿入)を作製した。解析の結果、<i>POLD3</i>^{-/-}細胞で見られた損傷乗越え DNA 合成活性の低下が、<i>POLD3</i>^{-/-}/<i>POLD1</i>^{exo}細胞では、大きく回復した。一方、損傷乗越え DNA 合成ポリメラーゼの一つが欠損した細胞に <i>POLD1</i>^{exo}の変異を追加しても元の欠損細胞の表現型には全く影響を与えなかった。この結果は、校正機能が、他の損傷乗越えポリメラーゼによる損傷乗越え DNA 合成をトランスに抑制するのではなく、Polδによる損傷乗越え DNA 合成そのものを抑制することを示す。また、精製 Polδホロ酵素を使い、この酵素が試験管内でも損傷乗越え DNA 合成ができることも示した。</p> <p>本研究は、複製ポリメラーゼが損傷乗越え DNA 合成しうるという結果を示唆する。</p>			

(論文審査の結果の要旨)
<p>複製ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼδ (Polδ) は、DNA 複製に必須であり、非常に正確に DNA 合成できる。その正確さは以下の 2 つの分子機構による。(1) Polδの触媒活性中心が空間的に非常に狭いゆえに正常にペアーした 2 つのヌクレオチドしか触媒活性中心に入りこめない。(2) ミスペアーしたヌクレオチドを除去する校正活性を持つ。この 2 つの分子機構は、損傷ヌクレオチドを鋳型に使い DNA 合成する(損傷乗越え DNA 合成と呼ぶ)ことも防ぐ。</p> <p>先行論文において、Polδの構成因子、POLD3 の遺伝子破壊が、損傷乗越え DNA 合成活性を大きく低下させることを報告した。しかし、この知見は、POLD3 が Polδ以外の損傷乗越えポリメラーゼに働きかけている可能性を否定出来なかった。</p> <p>本研究は、Polδそのものが損傷乗越え DNA 合成するかを検証する目的で、POLD3 破壊株にさらに Polδの校正機能を欠損させる点変異をノックインした。その結果、校正機能欠損 Polδが損傷乗越え DNA 合成を高い効率で起こすことを、細胞生物学的実験と生化学実験とで確認した。この結果は、複製ポリメラーゼが損傷乗越えしうるという結論を示唆するものである。</p> <p>本研究は、ガン細胞において、点変異が蓄積するメカニズムを解明することに寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 27 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>